

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

Über den Reaktionsmechanismus
der $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Markierung
von Erythrozyten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
GEORG WALTHER
geb. in Dresden

1965

Mainz 1964

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

Über den Reaktionsmechanismus
der $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Markierung
von Erythrozyten

Inaugural-Dissertation

zur

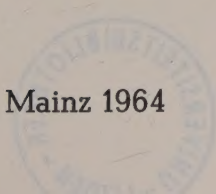
Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von

GEORG WALTHER

geb. in Dresden

Mainz 1964



Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

Über den Reaktionsmechanismus
der $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Markierung
von Erythrozyten

Magister-Dissertation

von

Erkennung der Fachbereiche
der I. Medizinischen Klinik
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Dekan:

Professor Dr. K. Thomsen

Referent:

Privatdozent Dr. J. Fischer

Korreferent:

Professor Dr. R. Duesberg

Tag der mündlichen Prüfung: 2.2.1965



Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung	1
1. ^{51}Cr in der Hämatologie	1
2. Vorstellungen über den Aufbau der Erythrozytenmembran	2
II. Experimenteller Teil	7
1. Problemstellung	7
2. Methodik	9
3. Ergebnisse	12
A. Inkubation in Abhängigkeit von	
a) Temperatur	12
b) Hämatokrit	14
c) NaCl -Konzentration	16
d) Lagerungszeit	19
B. Einfluß einer Vorbehandlung mit Glutathion auf den Inkubationsverlauf	24
C. Markierung mit in Hämolysat gelöstem $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$	25
D. Markierung mit	
a) ^{110}Ag nach Vorbeladung mit Na_2CrO_4	26
b) ^{51}Cr nach Vorbeladung mit Ag	28
III. Diskussion der Ergebnisse	29
IV. Zusammenfassung	31
V. Literaturverzeichnis	32

I. Einleitung

1. ^{51}Cr in der Hämatologie

Seit 1950 ist die Markierung von Erythrozyten mit ^{51}Cr bekannt (31). Die klinische Medizin und die biologische Forschung bedienen sich dieser Methode zur Bestimmung des zirkulierenden Blutvolumens, der Zirkulationsdynamik, der Erythrozytenlebensdauer und der Feststellung des Ortes des Blutabbaus.

Eine weit über die Hämatologie hinausgehende Anwendung haben ^{51}Cr -markierte rote Blutkörperchen in der Szintigraphie gefunden. Mit Hilfe von ^{51}Cr -markierten, wärmealterierten Erythrozyten kann in einfacher und zuverlässiger Weise Lage, Form und Größe der Milz szintigraphisch erfaßt werden (21,22,24). Darüber hinaus lassen sich auf diesem Wege erstmalig auch quantitative Aussagen über eine definierte Funktion der Milz und des retikulohistocytären Systems machen (19,23).

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen nimmt man folgenden Einbaumechanismus an: Das sechswertige Cr penetriert als CrO_4^{--} -Komplex die semipermeable Membran, wird innerhalb des Erythrozyten zu dreiwertigem Cr reduziert und darauf an die Globinfraktion des Hämoglobins gebunden (31,81). Die Bindung erfolgt bevorzugt an den β -Ketten (34,67,68). Im Bereich von pH 7 findet, wie die Untersuchungen von Gray und Sterling (31) sowie Mundschenk und Fischer (60) zeigten, eine Penetration der Erythrozytenmembran von dreiwertigem Cr nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß statt. Das deutet darauf hin, daß die Erythrozytenmembran für dreiwertiges Cr praktisch impermeabel ist, was auch aus Elutionsversuchen verschie-

dener Autoren hervorgeht (16,40,60). Das sechswertige Cr in der chemischen Verbindung Na_2CrO_4 bietet sich daher wegen seiner günstigen Eigenschaften für Untersuchungen am Erythrozyten an.

2. Vorstellungen über den Aufbau der Erythrozytenmembran

Zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen Methoden sprechen dafür, daß an der Erythrozytenoberfläche eine besondere Zusammensetzung und Anordnung der Moleküle besteht, die als Zellmembran angesprochen werden kann. Diese kann auf elektronenoptischem Wege sichtbar gemacht werden. Es ist hierbei zu bedenken, daß durch die spezielle Präparation erhebliche Veränderungen an der Zelloberfläche auftreten, so daß bei der Deutung von Einzelstrukturen Vorsicht zu walten hat. Hug und Lippert (39) sprechen deshalb auf Grund ihrer elektronenmikroskopischen und phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen von einer Niederschlagsmembran an der Grenze zwischen zwei Medien, die in Wechselwirkung miteinander stehen. Sie lassen allerdings offen, ob sich darunter das Substrat der natürlichen Grenzschicht verbirgt oder ob es sich um eine Anordnung oberflächlicher Moleküllagen unter Einwirkung der Oberflächenkräfte handelt. In polarisiertem Licht zeigt die Oberfläche Doppelbrechung, so daß eine wohlorganisierte Lagerung von oberflächlichen Lipoidmolekülen angenommen werden kann. Auch Stoffwechseluntersuchungen sprechen für das Vorhandensein einer Zellmembran. Ihr kommen spezifische Funktionen zu, da sie nicht nur passiv semipermeabel ist, sondern, wie man heute allgemein annimmt, aktiv in den Stoffwechsel eingreift. Wenkster und Engelhardt (32) rechnen die Zellmembran neben Kern, Mitochondrien und Zytoplasma zu den Zellorganellen.

Als anerkannt gilt heute die Bläschen- bzw. Ballonstruktur des Erythrozyten. Mit elektronenoptischen Untersuchungen (46) konnte ein Schwammgefüge nicht nachgewiesen werden. Die bikonkave Form wird nach London (49) u.a. auf energieliefernde chemische Umsetzungen zurückgeführt, die auf das Vorliegen von energiereichen Phosphatverbindungen zurückgehen.

Als Hauptbestandteile der Membran ließen sich Proteine und ätherlösliche Lipide nachweisen. Nach Erickson (20) teilen sich letztere in Phospholipide, Cholesterin und Zerebrosin auf, wobei das Mengenverhältnis ca. 5:2:1 beträgt. Die Gesamtmenge pro Erythrozyt wird mit 400×10^{-12} mg angegeben, was einer bimolekularen Anordnung bei radialer Orientierung entspricht und eine Membrandicke von 40 Å ergibt. Die Lipide liegen hierbei auf einer Proteinschicht, deren Moleküle tangential angeordnet sind. Dabei verbinden sich Stromatinmoleküle von 1000 Å Länge mit den Lipiden zum Reticulin bzw. Stromin (37,45,58). Über den Feinbau gehen die Meinungen noch auseinander. Einerseits wird von lamellarem Schichtbau aus Grenzflächenlipoiden und Stromatineiweiß (82,83), andererseits von einer Netz- bzw. Mosaikstruktur aus einem Eiweißgerüst mit eingelagerten Lipiden gesprochen (3,57).

Auf Grund umfassender Untersuchungen kamen Winkler und Bungenberg de Young (96) zu ihrem Membranmodell, das eine radiale Ausrichtung der Stromatinmolekel mit einem monomolekularen Lipoidfilm auf der Oberfläche vorsieht. Dagegen ist bei Ponder (71) das Stromatin tangential angeordnet und der Lipoidfilm bimolekular. Wolpers (97) sprach sich ebenfalls für die Mosaikstruktur aus. Durch Behandlung der Membranen mit Lipoidlösungsmitteln konnte er elektronenmikroskopisch in der vorher glatten Oberfläche in gleichmäßigen Abständen Substanzdefekte feststellen. Jung (42) kommt bei seinen Hämolyseversuchen unter ver-

schiedenen Bedingungen, sowie auf Grund der Beurteilung pathologischer Veränderungen, zu der Annahme, daß die Membran aus zwei morphologisch und funktionell verschiedenen Komponenten bestehen muß. Er bezeichnet die äußere, im wesentlichen aus Lipoid bestehend, als Epilemma, während er die darunterliegende "Gerüstsubstanz" als bei 49°C koagulierbares Eiweiß ansieht.

Die Innenseite der Membran erscheint nicht glatt, sondern enthält Hämoglobinmoleküle eingelagert, die nicht auswaschbar sind, was der bei Schilling (79) angegebenen Crusta entspricht. Weiterhin sind noch Untersuchungen von Lovelock (51) zu erwähnen, der mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ beträchtliche Anteile der Membran abtrennen konnte, ein Befund, der ebenfalls für den lamellaren Aufbau sprach.

Über die effektive Dicke gehen die von den verschiedenen Autoren angegebenen Werte weit auseinander. Je nach der verwendeten Methodik: quantitativer Analyse (45,70,63), Elektronenmikroskopie (4,36,44), leptoskopische Untersuchungen (91) oder Versuche mit Hilfe der Ultrazentrifuge (53,62) bewegen sich die Angaben zwischen 50 und 1000 Å.

Zur Erklärung der Phänomene bei der Penetration verschiedener Substanzen durch die Membran benutzten Mond (56) u.a. folgende Hypothese: die Erythrozytenmembran ist von wassergefüllten Poren durchzogen, deren Wandung, im Gegensatz zur negativen Oberflächenladung des Erythrozyten, mit positiven Ionen besetzt ist. Die pH-Abhängigkeit bei Untersuchung der selektiven Anionenpermeabilität deutet Solomon (85) dahingehend, daß es sich bei diesen Ionen um dissoziierbare Aminogruppen in einer Konzentration von 3 Mol/l handelt. Es bleibt aber offen, welche Gestalt und welche Abmessungen diese Poren haben, ob sie gleiche oder unterschiedliche Dimensionen aufweisen. Unsicher in diesem Punkt sind auch elektronenmikroskopische Aufnahmen. Man kann nicht entscheiden, ob es sich

hierbei um die eigentliche Struktur oder um Gebilde des Zufalls handelt. Man benutzt den Ausdruck "Pore" daher nur als Kennzeichnung des Penetrationsweges (64).

Jacobs et al. (41) haben die Penetration von H_2O ins Erythrozyteninnere bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Sie errechneten eine Aktivierungsenergie von 3,9 kcal/Mol. Dieser Wert entspricht der Aktivierungsenergie für die Viskosität des Wassers. Es kann deshalb, zumindest in diesem Fall, eine Penetration wie bei der Diffusion in makroskopischen Röhren angenommen werden, wobei keine Reibung an der Porenwandung auftritt.

Im physikalischen Sinn dürfte die Membran unstabil sein. Ihre Existenz erklärt sich nur aus der kontinuierlichen Synthese von Lipidkomponenten, was auf Grund der beträchtlichen Reserven an Membranbaumaterial im Erythrozyten möglich ist (42). Durch radioaktive Markierung von Lipidbausteinen konnte Altmann (1) eine durchschnittliche Lebensdauer der Membranlipide von drei Tagen feststellen.

Für die Penetration der Membran wurden verschiedene Wege gefunden: a) lipoidlösliche Verbindungen dringen über die Lipidschicht der Membran in die Zellen ein; für die Penetration besteht eine Abhängigkeit zwischen den Diffusionskoeffizienten und der Molekülgröße (86); b) Anionen diffundieren im Gefälle ihres elektrochemischen Potentials, während Kationen elektrostatisch abgestoßen werden (84,95). Entsprechend findet man z.B. für Cl^- -Ionen wesentlich größere Diffusionsgeschwindigkeiten ($T_{1/2} = 0,11-0,24$ sec) als für K^+ ($T_{1/2} = 45$ Stdn.) (86). Diese elektrostatisch bedingte Selektivität der Erythrozyten ist allerdings sehr unvollkommen ausgeprägt.

Es ist bekannt, daß für K^+ ein Konzentrationsverhältnis in Erythrozyten und Plasma von 16:1 besteht. Das läßt sich nicht auf eine selektive Undurchlässigkeit der Mem-

bran gegenüber den diffundierenden Kationen zurückführen, sondern geht vielmehr auf die Existenz eines dynamischen Gleichgewichts zurück, das als sogenannter "aktiver Transport" bzw. Transport unter Energiezufuhr bezeichnet wird (89,90). Dieser Transport ist eng mit verschiedenen Fermentsystemen gekoppelt. So spielt die ATPase eine entscheidende Rolle beim Kationentransport (61). Die einzelnen Vorgänge dieser sogenannten Ionenpumpen sind weitgehend unbekannt.

Beim passiven Transport dagegen hängt der Umfang des Stoffaustausches von dem vorliegenden Konzentrationsgefälle sowie von elektrochemischen Einflüssen ab (Membranpotentiale).

Es handelt sich bei der Penetration durch die Membran also um ein sehr komplexes Geschehen, dessen Mechanismen im Detail noch weitgehend unbekannt sind. Es sollte hiermit nur ein Überblick gegeben werden. Auf einige spezielle Fragen wird noch bei der Behandlung der einzelnen Versuchsergebnisse eingegangen.

II. Experimenteller Teil

1. Problemstellung

In der Literatur sind über die Markierung von Erythrozyten mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ eine Reihe von Arbeiten erschienen, worauf im folgenden noch näher eingegangen werden soll. In dieser Arbeit soll darüber hinausgehend versucht werden, aus Modellversuchen Aufschluß über den Reaktionsmechanismus bei der ^{51}Cr -Markierung zu erhalten. Hierbei soll geklärt werden, ob Glutathion für die Reduktion des Chromates verantwortlich ist und inwieweit der Reduktionsvorgang an die intakte Zelle gebunden ist.

Zwei in höherer Konzentration vorkommende Reduktionsmittel im Erythrozyten sind Ascorbinsäure und Glutathion. Nach den Vorstellungen von Hopkins und Morgan (38) schützt reduziertes Glutathion (GSH) Ascorbinsäure vor der Oxydation und wird hierbei selbst zu GSSG oxydiert. Der Vorgang läuft primär über die Oxydation der Ascorbinsäure ab; die Dehydroascorbinsäure nimmt aber sofort 2 H-Atome des GSH auf und geht hierbei wiederum in Ascorbinsäure über. Glutathion ist darüberhinaus in der Lage, Schwermetalle komplex zu binden. Glutathion kommt im Vollblut in einer Konzentration zwischen 26,9 und 41,4 mg% vor (30,35), davon befinden sich ca. 98 % in den Erythrozyten. Es ist erforderlich zur Erhaltung der Struktur und stellt einen wichtigen Regulator für Enzyme, deren Aktivität an freie SH-Gruppen gebunden ist, dar. Im Erythrozyten ist GSH außerdem wichtig für die Hämoglobinreduktion. Nach Meldrum und Tarr (53) geschieht die Rückverwandlung des anfallenden GSSG durch Glutathionreduktase, die TPN spezifisch ist (1,73,76,88). Zum größten Teil liegt im Erythrozyten GSH vor. Für die im Vollblut enthaltene Ascorbinsäure finden sich in der Litera-

tur Werte zwischen 0,2 und 0,8 mg% (14,30,69). Das Verhältnis zwischen dem Ascorbinsäuregehalt in Plasma/Vollblut beträgt ca. 0,8.

Reaktionskinetische Grundlagen: Wie die Arbeit von Mundschenk und Fischer (60) u.a. zeigt, muß angenommen werden, daß der ^{51}Cr -Einbau ohne Trägerzusatz durch eine Reaktion 1.Ordnung bestimmt ist. Dieser Verlauf wird durch die folgenden Gleichungen beschrieben:

$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)$$

nach Integration:

$$\ln \frac{a}{a - x} = kt \quad k = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

a: Anfangskonzentration bei $t = 0$; entspricht der insgesamt eingesetzten ^{51}Cr -Aktivität.

x: umgesetzter Anteil in der Zeit t; Anteil der durch die Erythrozyten zur Zeit t gebunden wurde.

a - x: entspricht dem nicht umgesetzten Anteil zur Zeit t; der verbleibende Anteil der Aktivität im Plasma.

k: Geschwindigkeitskonstante.

Nach diesen Gleichungen müßte eine Auftragung in halb-logarithmischem Maßstab eine Gerade ergeben, deren Steigung k beträgt und deren Halbwertszeit von der Konzentration unabhängig ist. In Abb.1 ist eine derartige Auftragung erfolgt: halblogarithmisch in Prozent der Anteile der Plasmaaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Der lineare Verlauf der Kurven läßt wirklich annehmen, daß der Einbauvorgang durch eine Reaktion 1.Ordnung bestimmt ist. Bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurde jeweils die Geschwindigkeitskonstante (k) bestimmt. Sie ist bei fast allen Diagrammen als Ordinate eingetragen.

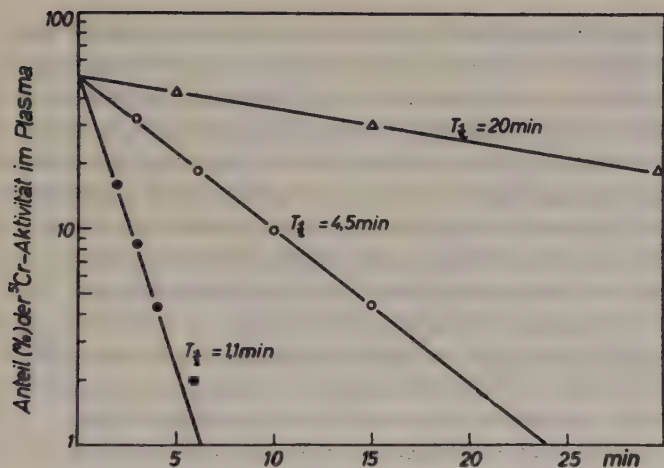


Abb. 1. Inkubation von Erythrozyten mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ bei verschiedenen Temperaturen.

10°C: $T_{1/2} = 20$ Min.

20°C: $T_{1/2} = 4,5$ Min.

30°C: $T_{1/2} = 1,1$ Min.

Halblogarithmische Auftragung der gemessenen Plasmaaktivität als Funktion der Zeit.

2. Methodik

$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung: Aus Saclay wurde über die Kernreaktor GmbH Karlsruhe die sterile, isotonische Lösung mit einer spezifischen Aktivität von ca. 115 mC/mg Cr bezogen. Mit physiologischer NaCl-Lösung wurde hiervon eine Stammlösung von ca. 1,5 $\mu\text{C}/\text{ml}$ hergestellt. Für den Klinikgebrauch wurde die Stammlösung (zu 100 $\mu\text{C}/\text{ml}$) mit

Sterofundin^{*)} hergestellt. Dabei trat eine teilweise Reduktion zu dreiwertigem Cr auf, was bei den Sättigungswerten einiger Versuchsserien deutlich wird. Statt einer normalen Sättigung bei einem Anteil von 95-96 % der Aktivität im Erythrozyten fanden sich Werte, die, je nach Alter der Lösung, nach vier Wochen bis zu 80 % abgefallen waren. Bei einem Kontrollversuch mit frischer mit NaCl hergestellter Stammlösung konnte aber kein Unterschied der Einbaugeschwindigkeit bei sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen festgestellt werden.

Markierungstechnik: In Blutkonservenflaschen von 500 ml Inhalt, die mit 100 ml ACD-Lösung^{**)} beschickt waren, wurde im Schlachthof frisches Rinderblut eingefüllt. Zur Entfernung der Plasmaphase wurde acht Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. In Glasröhrchen von 90x11 mm wurden bei Temperatur- und Alterungsversuchen jeweils 1 ml einer konzentrierten Erythrozytensuspension eingebracht und 1 ml der ⁵¹Cr-Lösung hinzugefügt, so daß während der Inkubation ein Hämatokrit von 40 % eingehalten werden konnte. Bei den Hämatokrit-Versuchen wurde, um die Inkubation jeweils mit einer Gesamtmenge von 2 ml durchführen zu können, bei niedrigem Hämatokrit das Erythrozytenkonzentrat verdünnt, und bei höheren Werten mit 1,5 ml Erythrozyten und 0,5 ml ⁵¹Cr-Lösung von 3 uC/ml gearbeitet.

Bei den Versuchen mit hypo- und hypertonen NaCl-Lösungen erfolgte zunächst eine Aufschlammung des Erythrozytenkonzentrates im Verhältnis 2:1 mit der jeweiligen NaCl-Lösung und anschließende Zugabe von 1 ml ⁵¹Cr-Lösung ebenfalls dieser Konzentration von ca. 3 uC, so daß die Inkubation mit einer Menge von 4 ml durchgeführt wurde.

^{*)} Sterofundin der Fa. B.Braun, Melsungen, enthält in 1000 ml 0,36 g Laktat.

^{**) ACD-Stabilisator der Fa. B.Braun, Melsungen.}

Die Inkubationen erfolgten bei Zimmertemperatur (24°C), bei den Versuchen mit definierten Temperaturen in einem Thermostat (Typ NBS der Gebrüder Haake AG), jeweils unter wiederholtem Umschütteln der Röhrchen. Durch scharfes Zentrifugieren, 7 min bei 3500 U/min, wurden die Inkubationen abgebrochen, der Überstand jeweils abgezogen und die Erythrozyten durch zweimaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung von ungebundenem ^{51}Cr befreit. Der Überstand und die beiden Waschlösungen wurden in 20 ml-Kölbchen vereinigt. Als Meßgerät zur Bestimmung der ^{51}Cr -Aktivitäten diente ein Szintillationszähler (GS-DMZ der Fa. Siemens gekoppelt mit NaJ-Bohrlochkristall der Fa. Friesseke und Hoepfner). Es wurde in Einkanalstellung gemessen, wodurch infolge des niedrigeren Null-effektes, relativ kurze Meßzeiten gesetzt werden konnten. Gemessen wurde jeweils die Aktivität der Erythrozyten (in den Inkubationsröhrchen) und ein aliquoter Teil (nämlich 1 ml) der vereinigten Überstände und Waschlösungen. Durch gleiche Bedingungen beim Messen entfielen so Korrekturen (Höhen-, Geometrie-, Absorptionskorrektur); aus den gemessenen Impulsraten konnte, nach Abzug der Nullrate, sofort der von den Erythrozyten aufgenommene ^{51}Cr -Anteil errechnet werden.

3. Ergebnisse

Aa. Markierung von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Temperatur (5,10,15,20,25,30,35,40,45°C) bei Inkubationszeiten zwischen 2 und 120 Minuten

Versuche von Donohue et al. sowie Cooper und Owen (11,16) zeigten erstmalig eine Beschleunigung der Inkorporation von Cr mit steigender Temperatur, während Schmidt et al. (80) Meßwerte von Untersuchungen bei 4,20 und 37°C angeben. Die angegebenen Inkubationsausbeuten entsprechen in den Fehlergrenzen denjenigen unserer Arbeit. Allgemein gilt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit wachsender Temperatur zunimmt. Bei einer Temperaturerhöhung um 10°C erhöht sich die Geschwindigkeit nach der R.G.T.-Regel von van't Hoff auf das Zwei- bis Dreifache. Demnach ist bei einer Temperatursteigerung von 1°C mit einer Reaktionsbeschleunigung von etwa 10 % zu rechnen. Dieser Temperaturkoeffizient wird als Q_{10} bezeichnet:

$$Q_{10} = \frac{k_{t+10}}{k_t}$$

Er beträgt für Enzymreaktionen 1,4-2,0, chemische Reaktionen 2-4 (Extremwerte 1,4-7), physikalische Vorgänge 1,2-1,3.

Zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Temperatur ergibt sich nach Arrhenius (6) eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten (k) vom reziproken Wert der absoluten Temperatur (T). Mathematisch kommt das in folgender Gleichung zum Ausdruck:

$$\log k = a - \frac{b}{T}$$

a und b sind für die Reaktion gegebene Konstanten.

Da die Ergebnisse (Abb.2) dieser Beziehung folgen und sich durchschnittlich ein Temperaturkoeffizient (Q_{10}) von drei feststellen läßt, soll an frischen und gelagerten Erythrozyten (Versuchsserie d) der k-Wert bei verschiedenen Temperaturen bestimmt werden und jeweils die Aktivierungsenergie errechnet werden. Dies geschieht nach der von Arrhenius angegebenen Gleichung:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E}{2,303 \cdot R} \cdot \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

k: Reaktionskonstante bei absoluter Temperatur T

G: Gaskonstante 1,986 cal/grad, Mol

E: Aktivierungsenergie.

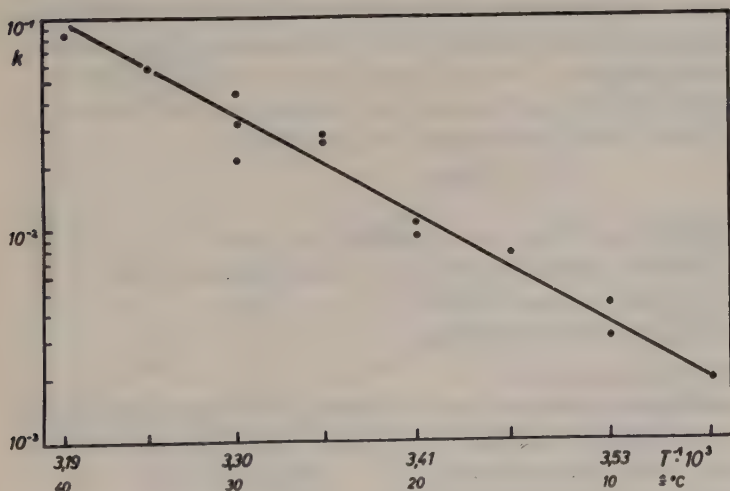


Abb.2. Einbaugeschwindigkeit von $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ in Erythrozyten in Abhängigkeit von der Temperatur. Darstellung der Reaktionskonstante (k) in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur (T).

Ab. Markierung der Erythrozyten mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ in Abhängigkeit vom Hämatokrit (im Bereich zwischen 5 und 65 %)

Der gewählten Versuchsanordnung entsprechend wurden jeweils bei einem Volumen von 2 ml mit gleicher ^{51}Cr -Konzentration (1,5 uC) verschieden große Anteile von Erythrozyten inkubiert; praktisch also mit verschiedenen Erythrozytenkonzentrationen gearbeitet. Die Inkubationszeit wurde jeweils entsprechend der Sättigung festgelegt. Dabei fand sich (Abb.3) eine lineare Abhängigkeit: Im Bereich der niederen Hämatokritwerte wurden die kleineren Reaktionskonstanten erhalten, was einem verlangsamten Einbau gleichkommt.

Interessant wäre auf Grund dieses Ergebnisses zu ermitteln, welcher Art von Reaktionen der Einbaumechanismus von $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ folgt; ob es sich um eine Oberflächenreaktion handelt, oder ob das Innere der Zelle dafür zuständig ist. Deshalb wurde zum Vergleich eine Funktion für einen Oberflächenprozeß aufgestellt:

$$K \cdot \frac{O}{V} = f(\text{Ht})$$

O: Gesamtoberfläche der Erythrozyten in cm^2

V: Volumen, Erythrozyten und Plasma, abhängig von

Ht: dem jeweiligen Hämatokrit

K: Proportionalitätsfaktor.

Dazu folgende Werte:

1 mm^3 Erythrozytenkonzentrat enthält 10^7 Erythrozyten (E)

O eines Rindererythrozyten = $130 \mu^2 = 1,3 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2$, d.h.

1 cm^3 Erythrozytenkonzentrat entspricht einer Oberfläche von $10^{10} \cdot 1,3 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 = 1,3 \text{m}^2$.

In Tabelle 1 erfolgte eine Berechnung von O/V für den Ht-Bereich von 5 bis 100%.

Ht	O	v	$\frac{O}{v}$
%	m ²	ml	m ² /ml
100	1,30	-	∞
90	1,17	0,1	11,70
80	1,04	0,2	5,20
70	0,91	0,3	3,03
60	0,78	0,4	1,95
50	0,65	0,3	1,30
40	0,52	0,6	0,86
30	0,39	0,7	0,56
20	0,26	0,8	0,33
10	0,13	0,9	0,14
5	0,065	0,95	0,07

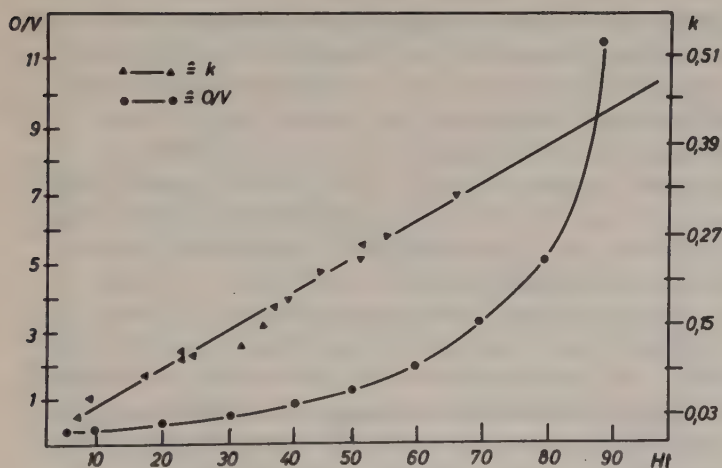


Abb.3. Inkubation von Erythrozytensuspensionen mit verschiedenem Hämatokrit mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$. Abhängigkeit der Reaktionskonstante (k) vom Hämatokrit.

In Abb.3 wurden die Werte für O/V und die Ergebnisse der Versuche zu Ab. eingetragen. Aus dem Verlauf der beiden Kurven ist deutlich ersichtlich, daß der Hämatokrit sich auf das Verhältnis O/V und den Verlauf der Geschwindigkeitskonstante k sehr unterschiedlich auswirkt. Daraus kann geschlossen werden, daß bei der ^{51}Cr -Markierung keine Oberflächenreaktion vorliegt.

Ac. Markierung der Erythrozyten in Abhängigkeit von der Kochsalzkonzentration (0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 % NaCl).

Den Gesetzen der Osmose zufolge tritt beim Erythrozyten in hypotoner Lösung eine Wasserabgabe auf. Lindemann (46) beschreibt die Vorgänge an der Membran im hypotonen Bereich. Während der Wasseraufnahme tritt anfänglich eine Veränderung der äußeren Gestalt des Erythrozyten von der Scheiben- in eine Kugelform ein (sogenannte Sphärocytenform). Dabei bleibt zunächst das Volumen gleich, während sich die Oberfläche verkleinert und damit auch die Poren verengen. Durch anschließende osmotische Schwellung vergrößert sich die Oberfläche und es kommt zu einer geringfügigen Dehnung der Membran. Man versuchte auch eine kolloidchemische Alteration nachzuweisen; das Auflösungsvermögen der heutigen Ultramikroskope reicht hierfür aber noch nicht aus. Für die schließlich eintretende Hämolyse macht er eine Zustandsänderung des Hämoglobins verantwortlich, indem er annimmt, daß die innerhalb der Zelle befindlichen makromolekularen Verbindungen ihre Form verändern und dadurch durch die Membran austreten können. Rapoport (77) nimmt eine bei der Kugelform vergrößerte osmotische und mechanische Fragilität an und konnte darüberhinaus eine vergrößerte

Glykolyse und Vermehrung der organischen Phosphatverbindungen im Erythrozyten feststellen. In hypertonen Lösungen dagegen schrumpft der Erythrozyt zur sogenannten Stechapfelform zusammen. Auf Grund der Schrumpfung der Membran müßten sich dabei die Poren verkleinern. Gleichermäßen darf angenommen werden, daß sich die Einbaugeschwindigkeit nach der hypotonen Seite hin vergrößert, während sie im hypertonen Bereich sich verringert. Aus Abb.4 ist zu entnehmen, daß der Kurvenverlauf der von Lindemann beschriebenen Theorie folgt: zwischen 0,9 und 0,8 % NaCl-Konzentration läßt sich eine gewisse Verlangsamung des Einbaus nachweisen.

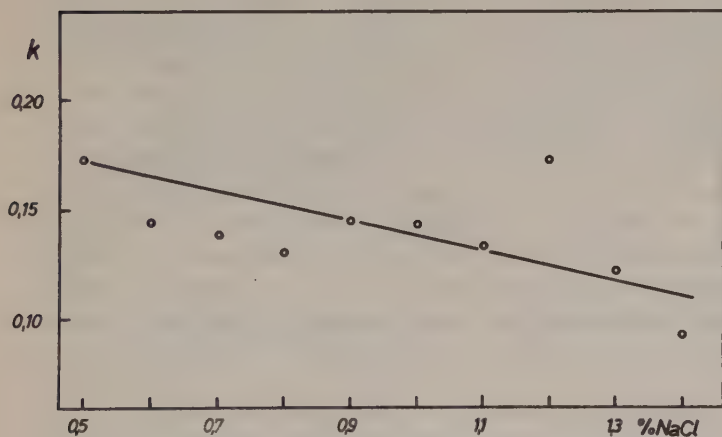


Abb.4. Inkubation von Erythrozytensuspensionen bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Abhängigkeit der Reaktionskonstante (k) von der NaCl-Konzentration.

Bei 0,4% trat bei der Zentrifugation eine mäßige Hämolyse auf, so daß dieser k-Wert nicht voll zu werten ist. Zur Klärung der Streuung der k-Werte im hypertonen Bereich wurden Versuche mit den Extremwerten (0,5, 0,9 und 1,4 % NaCl) an drei aufeinanderfolgenden Tagen vom gleichen Blut wiederholt. Abb.5 zeigt eine in den Fehlergrenzen liegende gleiche lineare Abhängigkeit; hierbei wird allerdings deutlich, daß am zweiten und dritten Tag etwas höher liegende Geschwindigkeitskonstanten erreicht werden. Hieraus darf man schließen, daß nicht vernachlässigbare Veränderungen an der Membran im Sinne einer größeren osmotischen Fragilität aufgetreten waren, obwohl das Blut im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert wurde. Hier ist zu erwähnen, daß auch bei den anderen Versuchen aus technischen Gründen (Blut konnte nur einmal in der Woche bezogen werden) Inkubationen am zweiten und dritten Tag stattfanden, aber keine so ausgeprägte Streuung auftrat. Es dürfte sich bei den Konzentrationsversuchen um eine Überlagerung der osmotischen und mechanischen Resistenzminderung handeln.

Haut et al. (33) beobachteten ebenfalls diese Änderung der Fragilität besonders in den ersten 72 Stunden und versuchen sie mit den Stoffwechselveränderungen zu erklären: So der Kaliumverlust ab 2. Tag und das langsame Aufhören der Glykolyse und schließlich ab dritten Tag die Erschöpfung der ATP Vorräte.

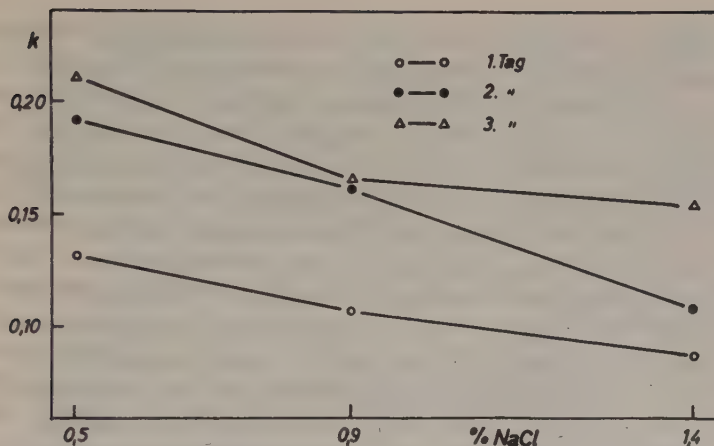


Abb.5. Inkubation von Erythrozytensuspensionen der gleichen Blutprobe an drei aufeinanderfolgenden Tagen bei NaCl-Konzentrationen von 0,5, 0,9 und 1,4 %. Abhängigkeit der Reaktionskonstante (k) von der NaCl-Konzentration.

Ad. Markierung von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Proben aus einer Konserve wurden in der ersten, dritten und fünften Woche bei Temperaturen von 10, 20 und 30°C mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ inkubiert und die k -Werte bestimmt. Anschließend wurde unter Anwendung der Arrhenius'schen Gleichung die Aktivierungsenergie errechnet.

Comfort (10) sprach 1954 aus, was auch heute noch weitgehend gültig ist: "Gegenwärtig basieren alle Theorien über Alterung auf unbewiesenen Annahmen wegen Fehlens der ursächlichen Fakten". Eine Vielzahl von Untersuchungen hat sich mit den Veränderungen der Erythrozyten während der Alterung befaßt und Ergebnisse veröffentlicht, von denen hier einige angeführt werden sollen und zwar diejenigen, die von Lagerung des Blutes in ACD-Lösung berichten. Brüscke und Richter (9) sowie Wilbrand (94) erklären die Alterung als eine Abnahme der selektiven Permeabilität, die in einem Ausgleich der intra- und extracellulären Elektrolyte zum Ausdruck kommt. Damit soll gleichzeitig eine Abnahme der osmotischen Resistenz verbunden sein. Untersuchungen an jungen, gewaschenen Erythrozyten ergaben in hypotonischen Lösungen eine größere osmotische Resistenz gegenüber alten Zellen. Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen von Stewart et al. (87) und Cruz (12), die eine geringere Resistenz junger Zellen feststellen konnten. Pranker (72) arbeitete ebenfalls getrennt mit alten und jungen roten Blutzellen und fand hierbei einen größeren Lipidgehalt der jungen Zellen, keine Differenz im Gehalt an Glutathion und Phosphatesteren und gleiche Osmoseresistenz. Allerdings stellte er fest, daß die alten Zellen nach der Inkubation eine größere Porosität aufwiesen. Mit größter Wahrscheinlichkeit dürfte die Theorie von Wilbrand zumindest für den Cr-Einbau zutreffen. In den ersten Tagen der Lagerung handelt es sich im wesentlichen um reversible Veränderungen am Erythrozyten und seiner Membran. Beurteilt an der Überlebenszeit nach Reinjektion konnte Lontit et al. (49) nämlich nach einer Lagerung von 3 bis 10 Tagen bei 4°C in ACD-Lösung keine oder nur geringe Änderungen der Lebensfähigkeit feststellen. Zu diesen Veränderungen zählt unter anderem die Herabsetzung des

Glukosemetabolismus (59,80), die durch eine Störung des intracellulären Phosphatstoffwechsels bedingt ist. Hierzu sind Veröffentlichungen von Finch, Gabrio, Donohue et al. (17,18,25,26,27,28) und Pranker (75) zu erwähnen, die darauf hinweisen, daß bei Zugabe von Adenosin zu den Blutkonserven die Haltbarkeit fast verdoppelt werden kann. Hierbei konnte beispielsweise nach einstündiger Inkubation von drei Wochen altem Blut bei 37°C eine Regeneration von organischen Phosphaten (55), eine Verbesserung der osmotischen Resistenz und eine Zunahme intracellulären Kaliums nachgewiesen werden. Verantwortlich für die Regeneration ist die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH), die ab siebten Tag der Lagerung einen starken Abfall zeigte. Dadurch steigt die Gesamtsäurebildung bis auf das zwanzigfache, während die Werte der Milch- und Brenztraubensäurebildung zurückgehen (Löhr et al. 47).

Zusammenfassend ließen sich folgende Lagerungsschäden nach 3 Wochen in ACD-Konserven bei 4°C nachweisen: Abnahme der osmotischen und mechanischen Resistenz, Austritt intrazellulären Kaliums und Eintritt von Natrium (15,43,47,48,52,77,78,93), Abnahme der organischen Phosphatester, besonders des ATP und des 2,3 DPGS (3,26,29,30,32,47,48,74,93), ebenfalls des DPN (48). Auch die Konzentration des GSH (7) geht zurück.

Als Ursachen für diese Veränderungen gelten einerseits die natürliche Alterung wie in vivo, die durch die Lagerung in der Kälte verlangsamt wird, andererseits bedingt der Stabilisator gewisse Störungen im Erythrozytenstoffwechsel; außerdem verbleiben die Endprodukte des Erythrozytenstoffwechsels in der Konserve, die ja ein geschlossenes System darstellt. Es wird deshalb der Vorschlag gemacht, zur Konservierung den Konserven außer ACD-Lösung noch Adenosin beizufügen. Für den Cr-Einbau ergaben sich

bei Schmitt et al. (81) allerdings kein Unterschied zwischen in ACD und in ACD mit Inosinzusatz gelagerten Erythrozyten. Allgemein berichten sie nur von einer etwas zunehmenden Einbaurrate nach vierwöchiger Lagerung, was sie durch eine Zunahme an Acidität bedingt sehen.

Unsere Untersuchungen setzen hier an mit der Fragestellung, ob und in welcher Weise sich die Einbaurrate nach der Lagerung ändert. Hierbei soll die nach Arrhenius berechnete Aktivierungsenergie als Maß für die veränderte Permeabilität betrachtet werden. Abb.6 zeigt für den Einbau in frische Erythrozyten einen geringeren Anstieg der Kurve, damit eine niedrigere Einbaurrate im Gegensatz zu den gelagerten in der dritten und fünften Woche, die parallel verlaufend einen gleichen Anstieg aufweisen. Es kann daraus entnommen werden, daß Änderungen der Permeabilität im Sinne einer größeren Durchlässigkeit der Membran in der ersten bis zweiten Woche abgeschlossen sind. In Tabelle 2 sind die zugehörigen Aktivierungsenergien zu entnehmen.

Tab.2. Nach Arrhenius errechnete Aktivierungsenergie (in kcal) bei Inkubation frischer und in ACD-Lösung gelagerter Erythrozyten und Aufstellung der zugehörigen k-Werte.

	$k_{10^{\circ}}$	$A(10-20^{\circ})$	$k_{20^{\circ}}$	$A(20-30^{\circ})$	$k_{30^{\circ}}$
1.Woche	0,030	18,5	0,092	14,6	0,210
3.Woche	0,034	24,9	0,154	25,0	0,630
5.Woche	0,041	24,6	0,182	25,6	0,770

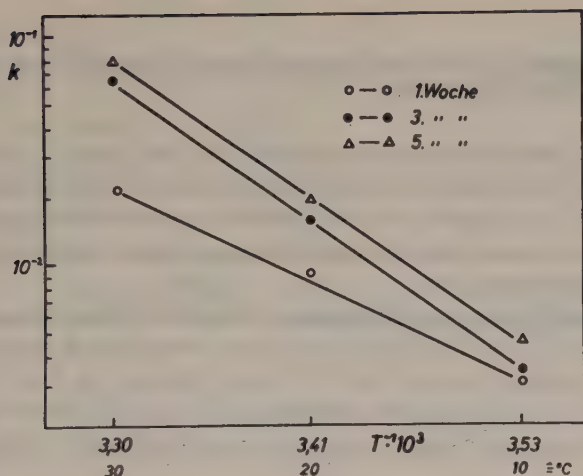


Abb.6. Inkubation von frischen und gelagerten (3 und 5 Wochen) Erythrozyten jeweils bei Temperaturen von 10, 20 und 30°C.

In der Literatur finden sich Angaben über die Aktivierungsenergie für die Sulfatpenetration bei Passow (65), der einen Wert von 28-30 kcal/Mol errechnete. Solomon (85) bestimmte die Aktivierungsenergie bei der Natrium- und Kaliumpermeation und kam für K^+ bei der Aufnahme bzw. Abgabe auf $12,3 \pm 1,3$ kcal/Mol, bei Na^+ für die Aufnahme auf $20,2 \pm 2,7$ kcal/Mol und $14,9 \pm 3,4$ für die Abgabe.

B. Einfluß einer Vorbehandlung mit Glutathion auf den Inkubationsverlauf

Mit diesen Untersuchungen sollte die Reaktionskonstante der Reduktion von $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ durch Glutathion bestimmt werden, um entscheiden zu können, inwieweit Glutathion für die Reduktion des sechswertigen Cr im Erythrozyten in Frage kommt.

Durchführung der Versuche: Chromat wird mit Mengen von 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 mg/ml Glutathion versetzt und jeweils nach 2, 5, 10, 15 und 30 Min. je 1 ml davon mit 2 ml Erythrozyten zusammengebracht. Als Inkubationszeit wird eine Stunde gewählt, der Hämatokrit beträgt 50 %.

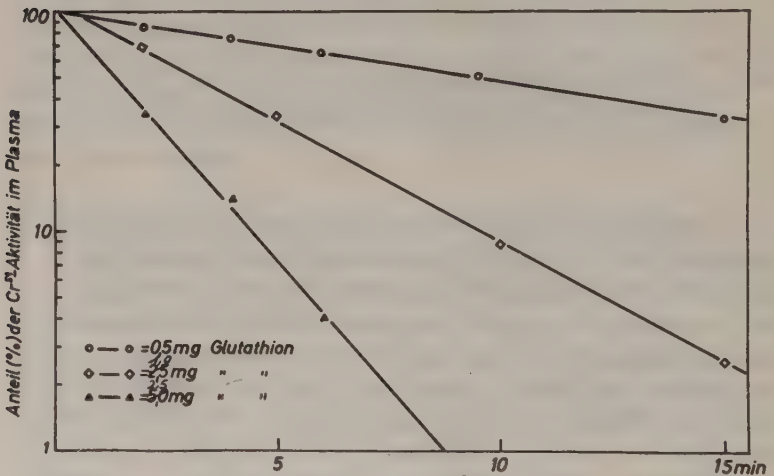


Abb.7. Bestimmung der Reaktionskonstante der Reduktion von Na_2CrO_4 durch Glutathion. Anteil des reduzierten Chroms (= Plasmaaktivität) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei drei verschiedenen Glutathionkonzentrationen (0,5, 1,0 und 2,5 mg/cm³).

Es fanden sich - wie aus Abb.7 ersichtlich - folgende Werte:

$$k_{0,5} = 0,069$$

$$k_{1,0} = 0,247$$

$$k_{2,5} = 0,462;$$

bei den Versuchsreihen mit 5 und 10 mg/ml war die Reduktion in den ersten Minuten schon so stark, daß keine k-Werte bestimmt werden konnten.

C. Markierung mit in Hämolysat gelöstem $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$

Mit diesen Untersuchungen soll geklärt werden, ob der Reduktionsvorgang an die intakte Zelle gebunden ist, oder ob auch Zellbestandteile zur Reduktion befähigt sind.

Durchführung der Versuche: 20 ml gewaschene Erythrozyten werden in der Kühltruhe bei -20°C hämolysiert, nach dem Auftauen 10 ml $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung hinzugefügt und nach 2, 4, 6, 10, 15, 30, 60, 180 Min. zu jeweils 2 ml dieser Mischung 1 ml Erythrozytenkonzentrat zugegeben, daraufhin 60 Min. inkubiert und wie bei den vorherigen Versuchen gewaschen und gemessen.

Bei zwei Doppelversuchen wurde als Ergebnis (Abb.8) jeweils eine Reduktionsgeschwindigkeit von $T_{1/2} = 11,3$ Min. gefunden. In der Diskussion soll darauf noch eingegangen werden.

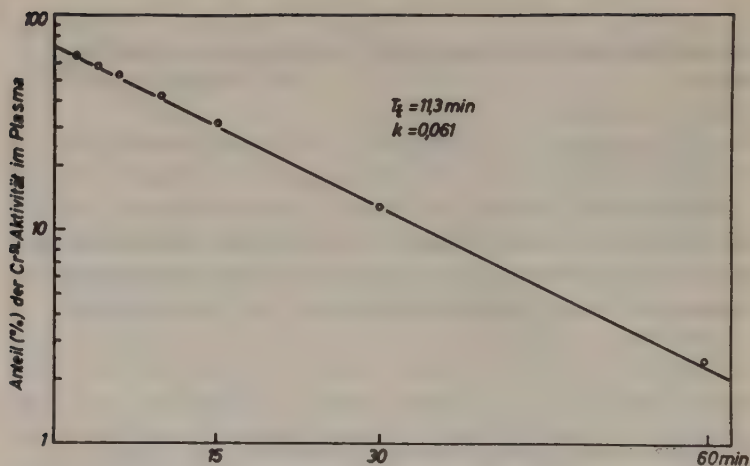


Abb.8. Einfluß der Vorbehandlung mit ^{51}Cr -Hämolysat auf den Inkubationsverlauf. Abhängigkeit der Plasmaaktivität von der Inkubationszeit.

D. Markierung mit

- a) ^{110}Ag nach Vorbehandlung mit Na_2CrO_4
- b) ^{51}Cr nach Vorbehandlung mit Ag

Wie schon eingangs ausgeführt, binden die SH-Gruppen Schwermetallgruppen. Geht man davon aus, daß sie in der Zelle in Form des Glutathions das Reduktionspotential ausmachen, müßten sie bei der Reduktion des CrO_4^{--} zu Cr^{+++} beteiligt sein. Blockiert man nun diese SH-Valenzen mit einem Schwermetall (in unseren Versuchen Ag), so müßte die Reaktionskonstante bei der Reduktion von CrO_4^{--} entsprechend herabgesetzt werden. Andererseits

wäre es interessant zu erfahren, wie die Aufnahme von Schwermetallen verändert wird, nachdem die Erythrozyten vorher mit CrO_4^{--} markiert wurden.

Durchführung der Versuche: zuDa) je 1 ml Erythrozytenkonzentrat werden mit 1 ml inaktivem Na-Chromat (2 mg/ml) 120 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend mit 1 ml $^{110}\text{Ag}(\text{CN})^-$ -Lösung versetzt und nach 2, 4, 6, 10, 15 Min. zentrifugiert, gewaschen und gemessen. Als Vergleich diente eine Serie mit NaCl-Lösung.

$^{110}\text{Ag}(\text{CN})^-$ wird wesentlich schneller eingebaut als $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$. Nach 2 Min. Inkubationszeit sind, wie aus Abb.9 hervorgeht, bereits 84 % der Ausgangsaktivität an den Erythrozyten gebunden, nach 30 Min. tritt eine Steigerung auf 86 % ein. Unerwartet steigert sich die Sättigungsrate nach Chromatvorbehandlung auf Werte zwischen 96 und 98 %.

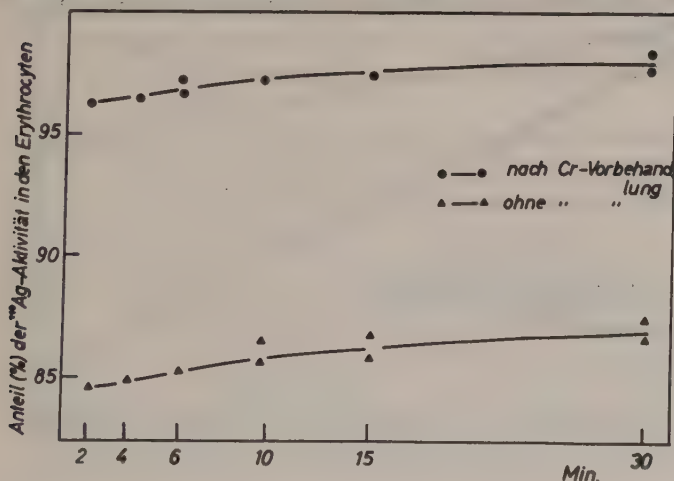


Abb.9. Einbau von Silber in normale und in Na_2CrO_4 -markierte Erythrozyten. Abhängigkeit des eingebauten Anteils von der Inkubationszeit.

Durchführung der Versuche: zu Db) je 1 ml Erythrozytenkonzentrat werden mit 1 ml inaktivem $[\text{Ag}(\text{CN})]^-$ (Serien mit 0,01, 0,1, 1,0, 5,0 mg/ml) 120 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend mit 1 ml $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung versetzt und nach 2,5, 5,0, 10, 20, 40, 80 Min. zentrifugiert, gewaschen und gemessen. Als Vergleich diente eine Serie mit NaCl-Lösung.

Für die Ag^+ -Konzentrationen von 0,01 und 0,1 läßt sich kein deutlicher Unterschied zum Einbau in unvorbehandelte Erythrozyten (in NaCl) feststellen. Bei höheren Konzentrationen wird die Verminderung der Einbaurate dagegen deutlich, wie aus Abb.10. hervorgeht:

$$k_{\text{NaCl}} = 0,086; \quad k_{1,0\text{Ag}^+} = 0,035; \quad k_{5,0\text{Ag}^+} = 0,002$$

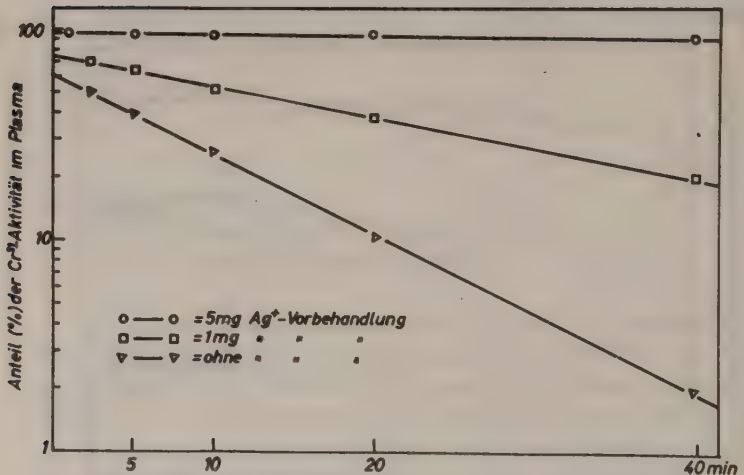


Abb.10. Hemmung des Chromateinbaus in Erythrozyten nach Silbermarkierung. Abhängigkeit des ungebundenen Anteils (Plasmaaktivität) von der Inkubationszeit.

III. Diskussion

Stellen wir die k-Werte für die Reduktion von CrO_4^{--} bei Hämatokrit ca. 50 % zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

- | | |
|---|---------------|
| 1. Reduktion durch intakte Erythrozyten | $k_1 = 0,240$ |
| 2. " " hämolysierte " | $k_2 = 0,057$ |
| 3. " " 0,5 mg/ml Glutathion | $k_3 = 0,069$ |
| 4. " " 1,0 mg/ml " | $k_4 = 0,247$ |
| 5. " " 2,5 mg/ml " | $k_5 = 0,462$ |

Es läßt sich also feststellen, daß der k-Wert für die Reduktion von hämolysierten Erythrozyten und Glutathion bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml annähernd gleich groß ist. Es darf also angenommen werden, daß das GSH, das in einer Konzentration von 26,9-41,4 mg% im Erythrozyten vorhanden ist, sehr wahrscheinlich für diese Reduktion verantwortlich ist. Mit einer wesentlichen Beteiligung anderer Reduktionssysteme ist offenbar nicht zu rechnen.

Blockiert man die SH-Gruppen des GSH durch Vorbeladung mit Ag^+ , so verlangsamt sich der ^{51}Cr -Einbau signifikant, so daß offenbar eine geringere Anzahl freier SH-Gruppen zur Verfügung stehen. Bei den parallelen Untersuchungen mit CrO_4^{--} -Vorbeladung und anschließender $^{110}\text{Ag}^+$ -Markierung erfolgt nicht der erwartete Effekt einer Absättigung des GSH und damit verminderter Ag^+ -Aufnahme, sondern gegenüber der normalen Ag^+ -Markierung (ohne CrO_4^{--} -Vorbeladung) trat eine unerwartete Steigerung des Ag^+ -Einbaus auf. Eine Erklärung dafür kann nach den vorliegenden Untersuchungen nicht gegeben werden.

Versuchen wir den Einbaumechanismus für $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ zu klären, so können wir auf Grund der Hämatokritversuche aussagen, daß es sich um keine Oberflächenreaktion handelt, denn dann müßten die k-Werte, in Beziehung zum Ht gesetzt, einen ähnlichen Kurvenverlauf ergeben wie die Funktion O/V , wie in Abb.3 ersichtlich.

Für die Aktivierungsenergie fanden sich Werte, die denjenigen in der Literatur angegebenen für chemische Prozesse gleichzusetzen sind. Während der ersten Zeit der Lagerung nimmt die Aktivierungsenergie zu, ab dritte Woche ist diese Veränderung aber sicher abgeschlossen. Bedingt ist diese Änderung der Aktivierungsenergie durch verschiedene Stoffwechselveränderungen, die bei den entsprechenden Versuchen bereits beschrieben wurden.

IV. Zusammenfassung

1) Nach der Gleichung von Arrhenius wurde die Aktivierungsenergie für den $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Einbau in Erythrozyten bestimmt. Es ergaben sich Werte zwischen 14,6 und 25,6, je nach dem Alter der Blutprobe.

2) Während der Lagerung des Blutes bei 4°C in ACD-Stabilisator ließ sich nach drei Wochen eine deutliche Erhöhung der Einbaurate für $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ feststellen, was in einer erhöhten Aktivierungsenergie zum Ausdruck kommt. Bei längerer Lagerung (nach fünf Wochen) ließ sich keine weitere Veränderung der Einbaurate finden.

3) Auf Grund eines Vergleiches der Funktionen $O/V = f(Ht)$ und $k = f(Ht)$ ließ sich darlegen, daß es sich beim Mechanismus der $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Markierung um keine Oberflächenreaktion handelt.

4) Bestimmt man die Einbaugeschwindigkeit für $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ in einer Reihe von hypo- und hypertonen NaCl-Lösungen, so findet man eine fast kontinuierliche Zunahme mit steigender NaCl-Konzentration.

5) Vergleicht man die Reaktionskonstanten für die Reduktion des $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ durch Hämolysat und Glutathion bei einer Konzentration von ca. 50 mg%, so finden sich annähernd gleiche Werte, was für eine Reduktion durch das im Erythrozyten enthaltene Glutathion spricht.

6) Blockiert man die SH-Gruppen des GSH mit Ag^+ , so verlangsamt sich der $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Einbau. Umgekehrt bei Ab-sättigung der SH-Gruppen durch Na_2CrO_4 tritt aber nicht die erwartete Verminderung des $^{110}\text{Ag}^+$ -Einbaus, sondern eine unerklärliche Steigerung ein.

V. Literaturverzeichnis

- (1) Altmann, K.I.: Some enzymologic aspects of human erythrocytes. *Amer.J.Med.* 27, 936 (1959)
- (2) Bartlett, G.R. and H.N.Barnet: Changes in the phosphate compounds of human red cell during blood bank storage. *J.clin.Invest.* 39, 56 (1960)
- (3) Bechhold, H.: Bau der roten Blutkörperchen und Hämolyse. *Münch.med.Wschr.* 68, 127 (1921)
- (4) Bernhard, W.: Electron microscope studies on thin sections of human erythrocyte. *Nature* 170, 359 (1952)
- (5) Bladergroen, W.: Einführung in Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge (1955)
- (6) Brdicka, R.: Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit, Grundlagen der physikalischen Chemie (1958)
- (7) Blanchaer, M.C., H.R.Williams and P.Weiss: Presence of the glycolytic enzymes D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, and triose-phosphate isomerase in hemolysates of preserved blood. *Amer.J.Physiol.* 181, 602 (1955)
- (8) Blum, K.V.: Stoffwechseleränderungen bei Lagerung von Blut. *Bibl.Haemat.* 12, 20 (1961)
- (9) Brüscke, G. und K.Richter: Erythrocytenalterung und osmotische Resistenz. *Zschr.ges.Innere Med.* 13, 486 (1958)
- (10) Comfort, A.: Biological aspects of senescence. *Biol.Rev.* 29, 284 (1954)
- (11) Cooper, M. and Ch.A.Owen: Labeling human erythrocytes with radiochromium. *J.Lab.Clin.Med.* 47, 65 (1956)
- (12) Cruz, O.O., P.F.Hahn, W.F.Bale and W.M.Balfour: Effect of age on susceptibility of erythrocyte to hypotonic salt solutions. Radioactive iron as means of tagging red blood cell. *Amer.J.med.Sci.* 202, 157 (1941)
- (13) Danielli, J.F.: Some properties of lipid films in relation of the structure of the plasma membrane. *J.cell.comp.Physiol.* 7, 393 (1936)

- (14) Czok, G. und H.Bramsel: Untersuchungen zur Vitamin-C-Versorgung der westdeutschen Bevölkerung. Dtsch.Lebensmittelrundschau 55, 111 (1959)
- (15) Danowski, T.S.: The transfer of potassium across the human blood cell membrane. J.biol.Chem. 139, 693 (1941)
- (16) Donohue, D.M., A.G.Motulsky et al.: The use of chromium as a red-cell tag. Brit.J.Haemat. 1, 249 (1955)
- (17) Donohue, D.M., C.A.Finch and B.W.Gabrio: Erythrocyte preservation: VI. The storage of blood with purine nucleosides. J.clin.Invest. 35, 562 (1956)
- (18) Donohue, D.M., B.W.Gabrio and C.A.Finch: Preservation and transfusion of blood. J.Amer.med.Ass. 161, 784 (1956)
- (19) Duesberg, R., J.Fischer: Die szintigraphische Darstellung der Milz als Ausdruck ihrer Lage und ihres Funktionszustandes. Med.Klin. 59, 429 (1964)
- (20) Erickson, B.N., H.H.Williams, F.C.Hummel, P.Lee and I.G.Macy: The lipid and mineral distribution of the serum and erythrocyte in the hemolytic and hypochromic anemias of childhood. J.Biol.Chem. 118, 569 (1937)
- (21) Fischer, J., R.Wolf: Grundlagen und Technik der Milz-szintigraphie. Acta hepat.-splenol. (Stuttgart) 10, 209 (1963)
- (22) Fischer, J., R.Wolf: Die quantitative Abschätzung der Milzgröße mit Hilfe der Szintigraphie. Dtsch.med. Wschr. 88, 1430 (1963)
- (23) Fischer, J., R.Wolf: Das Funktionsbild der sequestratorischen Leistung des retikuloendothelialen Systems. Tagung d.Schweiz.Ges.inn.Med. Genf, 1.-3.5.1964
- (24) Fischer, J., R.Wolf: Die szintigraphische Darstellung der Milz mit Radiochrom (^{51}Cr). Dtsch.med.Wschr. 88, 305 (1963)
- (25) Gabrio, B.W., D.M.Donohue, F.M.Huennekens and C.A.Finch: Erythrocyte preservation: VII. Acid-citrate-dextrose-inosine (ACDI) as a preservative for blood during storage at 4°C. J.clin.Invest. 35, 657 (1956)
- (26) Gabrio, B.W. and C.A.Finch: Erythrocyte preservation: I. The relation of the storage lesion to in vivo erythrocyte-senescent. J.clin.Invest. 33, 242 (1954)

- (27) Gabrio, B.W., M.Hennesey, J.Thomasson and C.A.Finch: Erythrocyte preservation: IV. In vivo reversibility of storage lesion. J.Biol.Chem. 215, 357 (1955)
- (28) Gabrio, B.W., D.M.Donohue and C.A.Finch: Erythrocyte preservation: V. Relationship between chemical changes and viability of stored blood treated with adenosine. J.clin.Invest. 34, 1509 (1955)
- (29) Gabrio, B.W., C.A.Finch and F.M.Huennkens: Erythrocyte preservation: A topic in molecular biochemistry. Blood 11, 103 (1956)
- (30) Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6.Aufl., 435 und 529 (1960)
- (31) Gray, S.J. and K.Sterling: The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. J.clin.Invest. 29, 1604 (1950)
- (32) Haenel, I., U.Haenel, G.Huber und K.H.Kärcher: Die Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels der Zelle durch Nucleoside. Klin.Wschr. 35, 141 (1957)
- (33) Haut, A., G.R.Tudhope, G.E.Cartwright and M.M.Wintrobe: Studies on the osmotic fragility of incubated normal and abnormal erythrocyte. J.clin.Invest. 41, 1766 (1962)
- (34) Heisterkamp, D., F.G.Ebaugh, Jr.: Site of attachment of the chromate ion to the haemoglobin molecule. Nature (London) 193, 1253 (1962)
- (35) Hennemann, G. und B.Hofmann: Die Bedeutung des Temperaturfaktors bei der Bestimmung des reduzierten Glutathion im Vollblut. Ärztl.Wschr. 12, 846 (1957)
- (36) Hillier, J. and J.F.Hoffman: On the ultrastructure of the plasmamembrane as determined by the electron microscope. J.Cell.and Comp.Physiol. 42, 203 (1953)
- (37) Höbner, R.: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe, Bern (1947)
- (38) Hopkins und Morgan zitiert aus: Leuthardt, F., Lehrbuch der Physiologischen Chemie (1959)
- (39) Hug, O. und W.Lippert: Grenzsichten animalischer Zellen im Elektronenmikroskop. Arch.für experimentelle Pathologie 213, 395 (1951)

- (40) Hughes Jones, N.C. and P.L.Mollison: The interpretation of measurements with ^{51}Cr labelled red cells. Clin.Sci. 15, 207 (1956)
- (41) Jacobs, M.H., H.N.Glassmann and A.K.Parpart: zit. Passow, H. No.64
- (42) Jung, F.: Strukturprobleme an roten Blutkörperchen. Naturwissenschaften 37, 254 (1950)
- (43) Kahn, J.B.Jr. and S.B.Cohen: Effect of ribosides and relatet compounds on cation transport in cold stored human erythrocyte. J.pharmacol.exp.Ther. 120, 9 (1957)
- (44) Katachalsky, A., D.Danon, A.Nevo and A. de Vries: Interactions of basic polyelectrolytes with red blood cell. Biochem. et Biophys.Acta 33, 120 (1959)
- (45) Leibetseder, F.: Strukturprobleme der roten Blutkörperchen. Wien.Zschr.Inn.Med. 44, 7 (1963)
- (46) Lindemann, B.: Die osmotische Hämolyse als Strukturproblem. Dtsch.Arch.klin.Med. 195, 449 (1949)
- (47) Löhr, G.W., H.D.Waller, O.Kanges, B.Schlegel und A.A.Müller: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten. Klin.Wschr. 36, 1008 (1958)
- (48) Löhr, G.W. und H.D.Waller: Zellstoffwechsel und Zellalterung. Klin.Wschr. 37, 833 (1959)
- (49) London, I.M.: Metabolism of the mammalian erythrocyte. Bull.N.Y.Acad.Med. 36, 79 (1960)
- (50) Loutit, J.F., P.L.Mollison and I.Maureen Young: Citric acid-sodium citrate-glucose mixtures for blood storage. Quant.J.exp.Physiol. 32, 183 (1943)
- (51) Lovelock, J.E.: The physical instability of human red blood cells and its possible importance in their senescent. Ciba Foundation colloquia on ageing. Vol.2 Ageing in Transient Tissues 215 (1956)
- (52) Maizels, M.: Factors in the active transport of cations. J.Physiol. 112, 59 (1951)
- (53) Mitchison, J.M.: zit. Nevo, A. No. 62
- (54) Meldrum, N.U. and H.L.A.Tarr: The reduction of glutathione by the Warburg-Christian System. Biochem. J. 29, 108 (1935)

- (55) Mollison, P.L. and M.A. Robinson: Observations on the effect of purine nucleosides on red-cell preservation. *Brit.J.Haemat.* 5, 331 (1959)
- (56) Mond, R.: Umkehr der Anionenpermeabilität der roten Blutkörperchen in eine selektive Durchlässigkeit für Kationen. *Pflügers Arch.ges.Physiol.* 217, 5 (1927)
- (57) Mond, R. und Hoffmann: Weitere Untersuchungen über die Membranstruktur der roten Blutkörperchen. Die Beziehungen zwischen Durchlässigkeit und Molekylvolumen. *Pflügers Arch.ges.Physiol.* 219, 467 (1928)
- (58) Moskowitz, M. and M. Calvin: On the components and structure of the human red cell membrane. *J.exp.cell.Res.* 3, 33 (1952)
- (59) Murphy, J.R.: Erythrocyte metabolism: II. Glucose metabolism and pathways. *Lab.clin.J.Med.* 55, 281 (1960)
- (60) Mundschenk, H. und J. Fischer: Zur Reaktionskinetik der Markierung normaler menschlicher Erythrozyten mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ und $^{51}\text{CrCl}_3$. *Pflügers Arch.ges.Physiol.* 275, 46 (1962)
- (61) Nagano, K. and M. Nakao: Cation carrier in the erythrocyte membrane. *J.Biochem.* 52, 99 (1962)
- (62) Nevo, A.: On the estimation of the thickness of the red cell membrane from ultracentrifuge studies. *Exp.Cell.Res.* 21, 286 (1960)
- (63) Parpart, A.K. and A.J. Dziemian: The chemical composition of the red cell membrane. Cold Spring Harbor Symp.quant.Biol. 8, 17 (1940)
- (64) Passow, H.: Passive Permeabilität von Zellmembranen, *Klin.Wschr.* 41, 3, 130 (1963)
- (65) Passow, H.: Sulfationenpermeabilität roter Blutkörperchen im Donnan-Gleichgewicht. Abstracts of Communications XXth Int.Physiol.Congr. Brüssel 216 (1956)
- (66) Passow, H.: Die Ionenpermeabilität roter Blutkörperchen. Ber. 9.Tag. dtsh.Ges.Bluttrans. Braunschweig 1960. *Bibl.haemat.* 12, 111 (1961)
- (67) Pearson, H.A., K.M. Vertrees: Site of binding of chromium 51 to haemoglobin. *Nature (London)* 189, 1019 (1961)

- (68) Pearson, H.A.: The binding of Cr^{51} to hemoglobin.
I. In vitro studies. Blood 22, 218 (1963)
- (69) Plötner, K.: Die chemische Zusammensetzung des Blutes und ihre Veränderungen. Handbuch ges.Haemat. Bd 2, 2.Teil, 1.Halbbd., 389 (1959)
- (70) Ponder, E.: Rehydration of human red-cell ghosts. Nature (London) 173, 1139 (1954)
- (71) Ponder, E.: The mammalian red cell and the properties of haemolytic systems. Protoplasma 22, 492 (1935)
- (72) Prankerdt, T.A.J.: The ageing of red cells. J.Physiol. 143, 325 (1958)
- (73) Prankerdt, T.A.J.: Red-cell structure and metabolism in haemolytic anaemia. Brit.med.Bull. 15, 54 (1959)
- (74) Prankerdt, T.A.J.: Chemical changes in stored blood with observations on the effects of adenosine. Biochem.J. 64, 209 (1956)
- (75) Prankerdt, T.A.J.: Cleavage of adenosine by human red cells. Brit.J.of.Haemat. 1, 408 (1955)
- (76) Rall, T.W. and A.L.Lehninger: Glutathione reductase of animal tissues. J.biol.Chem. 194, 119 (1952)
- (77) Rapoport, S.: Dimensional, osmotic, and chemical changes of erythrocyte in stored blood. I. Blood preserved in sodium citrate, neutral, and acid-citrate-glucose (ACD) mixtures. J.clin.Invest. 26, 591 (1947)
- (78) Ross, J.F., C.A.Finch, W.C.Peacock and M.E.Sammons: The in vitro preservation and post-transfusion survival of stored blood. J.clin.Invest. 26, 687 (1947)
- (79) Schilling, V.: Aussprache 54. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin. Dtsch.Arch.f.klin.Med. 195, 463 (1949)
- (80) Schmidt, H.A.E., H.Schmitt, W.Keiderling, M.Matthes und W.Peiser: Die Radiochrommarkierung als Mittel zur Wertigkeitsbestimmung von Blutkonserven. I.Mitt.: Der Einbau von $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ in frische und gelagerte Erythrozyten. Acta haemat. 23, 97 (1960)
- (81) Schmitt, H., H.A.F.Schmidt, M.Matthes und W.Keiderling: II.Mitt.: Die Bindung des Radiochroms in frischen und gelagerten Erythrozyten. Acta haemat. 23, 150 (1960)

- (82) Schmidt, W.J.: Polarisationsoptische Analyse eines Eiweiß-Lipoid-Systems, erläutert am Außenglied der Sehzellen. Kolloid-Z. 85, 137 (1938)
- (83) Schmitt, F.O., R.Bear and E.Ponder: Optical properties of the red cell membrane. J.cellul.a.comp.Physiol. 9, 89 (1936)
- (84) Solomon, A.K.: Red cell membrane structure and ion transport. J.gen.Physiol. 43, 5 (1960)
- (85) Solomon, A.K.: The permeability of the human erythrocyte to sodium and potassium. J.gen.Physiol. 36, 1 57 (1953)
- (86) Solomon, A.K.: The permeability of red cells to water and ions. Enzymes in blood. Ann.N.Y.Acad.Sci. 75, 175 (1958)
- (87) Stewart, W.B., J.M.Stewart, M.J.Izzo and L.E.Young: Age as affecting the osmotic and mechanical fragility of dog erythrocyte tagged with radioactive iron. J.exp.Med. 91, 147 (1954)
- (88) Szeinberg, A., C.Sherba, N.Hirshorn and E.Bodony: Studies on erythrocyte in cases with part history of favism and drug-induced acute hemolytic anemia. Blood 12, 603 (1957)
- (89) Teorell, T.: Zur quantitativen Behandlung der Membranpermeabilität. Ztschr.Elektrochemie 55, 460 (1951)
- (90) Ussing, H.H.: Transport of ions across cellular membranes. Physiol.Rev. 29, 127 (1949)
- (91) Waugh, D.F. and F.O.Schmitt: Investigations of the thickness and ultrastructure of cellular membranes by the analytical leptoscope. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 8, 233 (1940)
- (92) Wenkster, T.W. und W.A.Engelhardt: Die an der Oberfläche der kernhaltigen roten Blutkörperchen lokalisierte Adenosinpolyphosphatase. Folia Haemat. 76, 422 (1959)
- (93) Whittam, R.: Potassium movements and ATP in human red cells. J.Physiol. 140, 479 (1958)
- (94) Wilbrand, W.: Die Permeabilität der Zelle. Erg.Physiol. 204, 40 (1938)

- (95) Wilbrand, W.: Die Kinetik des Ionenaustausches durch selektiv semipermeable Membranen. Pflügers Arch.ges.Physiol. 246, 291 (1942)
- (96) Winkler, K.C. and H.G.Bungenberg de Young: Structure of the erythrocyte-membran. Arch.neerld. Physiol. 25, 467 (1940)
- (97) Wolpers, C.: Zur Feinstruktur der Erythrozytenmembran. Naturwissenschaften 28, 416 (1941).

L e b e n s l a u f

Am 4. September 1938 wurde ich als erstes Kind des Arztes Dr. Helmut Walther und seiner Ehefrau Maria Anna, geborene Pürner, in Dresden geboren.

Von 1944 bis 1952 besuchte ich die Volksschule und anschließend vier Jahre bis zum Abitur 1956 die Kreuzschule zu Dresden.

Meine erste Bewerbung zum Medizinstudium in Leipzig wurde abgelehnt; deshalb arbeitete ich ein Jahr als Hilfspfleger in einem Dresdner Krankenhaus.

1957 wurde ich an der Humboldt-Universität in Berlin immatrikuliert. Dort legte ich nach dem zweiten Semester die Prüfungen zum Vorphysikum ab. Aus politischen Gründen war ich gezwungen, Anfang 1959 meine Heimat zu verlassen. Ab Sommersemester 1959 setzte ich mein Studium an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz fort. Dort unterzog ich mich den Prüfungen für das medizinische Staatsexamen, das Ende Januar 1964 seinen Abschluß mit dem Gesamtergebnis "Gut" fand. Nunmehr absolviere ich meine Medizinalassistentenzeit.

